Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 3, Fall 2023, p. 787-799

Effect of Different Factors on Androgenesis Induction in Anther Culture of African Marigold (*Tagetes erecta*) and French Marigold (*Tagetes patula*)

R. Shafiee[1], M.R. Abdollahi[2*], A. Mirzaie-Asl[3], S.S. Moosavi[4], H. Sarikhani[5]

Received: 09-11-2022 Revised: 10-01-2023 Accepted: 14-01-2023 Available Online: 14-01-2023	**How to cite this article:** Shafiee, R., Abdollahi, M.R., Mirzaie-Asl, A., Moosavi, S.S., & Sarikhani, H. (2023). Effect of different factors on androgenesis induction in anther culture of African marigold (*Tagetes erecta*) and French marigold (*Tagetes patula*). *Journal of Horticultural Science*, *37*(3), 787-799. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2023.79502.1207

Introduction

Given the economic importance of growing flowers and plants in the world, the use of new technologies and methods in the improvement of ornamental plants in order to market them can play a significant role in marketing of these products and their trade in the international markets. Marigold (*Tagetes* spp.), is an annual and essential plant that is cultivated as an ornamental plant in many parts of the world (Neher, 1968). But in recent years, marigolds have been used as a commercial source of essential oils, biological compounds, pigments and cosmetics (Anonymous, 1976), control of malaria mosquitoes (Wanzala and Ogoma, 2013), antihypertensive, anti-inflammatory, antidepressant, antimicrobial, antimicrobial (Senatore and Feo, 1999), and control of nematode (Prasad *et al.*, 1992). Anther or microspore culture is known to be an effective method for producing haploid plants (Henry and De Baizer, 1980). Hybrid seed production requires pure line (as a parent), and the double haploid method can reduce the production period of pure lines to 5-6 years. Production of hybrid seeds in this valuable plant is of great importance, and the double haploid method can be important in this regard.

Materials and Methods

In the anther culture of marigold, a culture medium containing 0.2 mg/l of Naphthalene acetic acid and 1 mg /l of 6-Benzylaminopurine was used. In this study, the effect of genotype, bud size and mannitol on androgenesis induction of marigold anthers was evaluated during two separate experiments. A factorial experiment was conducted in a completely randomized design with two factors including genotype at 5 levels (T_1, T_2, T_3, T_4, T_5) and bud size at three levels (3-5, 5-10 and 10-15 mm) for first experiment. The second experiment was also performed as a factorial in a completely randomized design with 3 replications. In the recent experiment, the first factor included the method of mannitol application and the second factor included the different concentrations of mannitol (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 M). The factor of application method was in 2 levels: 1: adding different concentrations of mannitol to the solid culture medium and 2: pre-treating the anthers with the liquid culture medium containing different concentrations of mannitol for 24 hours. The T_4 genotype was used in the second experiment.

Results

In the first experiment, the effect of different bud sizes and 5 different genotypes on callus formation, mean number of shoot per anther, mean number of shoot per callus and percentage of complete plant regeneration in

1, 2, 3 and 4- M.Sc. in Plant Breeding and Associate Professors, Plant Production and Genetic Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: m.abdollahi@basu.ac.ir)
5- Full Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
https://doi.org/10.22067/jhs.2023.79502.1207

anther culture of marigold were studied. The results of this experiment showed that buds with the length of 5-10 mm have anthers which their microspores are at the proper growth and development stage for callogenesis and shoot production. The T_3 and T_4 genotypes, (both of them belonging to French species, *Tagetes patula*), produced the highest percentage of plant regeneration among the various cultivars. In the second experiment, we explored the impact of mannitol treatment on androgenic traits in marigold anther culture. Specifically, we examined two concentrations: 0.1 M and 0.2 M mannitol, both applied in the form of solid culture medium. Additionally, we investigated two concentrations, 0.0 M and 0.2 M mannitol, when applied as a pre-treatment in a liquid medium containing mannitol. These treatments yielded the highest percentage of callus formation. While the pre-treatment of anthers with a liquid culture medium containing 0.5 M mannitol led to the highest mean number of shoot per anther and the mean number of shoots per callus. Also, the pre-treatment with liquid medium containing 0.2 M mannitol showed the highest percentage of complete plant regeneration.

Conclusion

Results showed that in marigold, buds with the size of 5-10 mm contained microspores with mid-uninucleate stage to early bi-nucleate stage showed the highest response to the induction of androgenesis. Also, T_3 and T_4 genotypes belong to the French species showed the highest response to the regeneration. In another experiment, the pre-treatment of anthers with 0.2 and 0.5 M mannitol by using mannitol in a liquid culture medium for 24 hours, respectively showed the highest percentage of complete plant regeneration and the highest mean number of shoot per callus and anther. Chromosome counting results showed that 3 out of 5 examined plants were dihaploid and had 24 chromosomes in their root tip cells, while examined mother plants were tetraploid and showed 48 chromosomes in their root tip cells.

Keywords: Androgenesis, Anther culture, Haploid, Mannitol, Marigold

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۷، شماره ۳، پاییز ۱٤۰۲، ص. ۷۹۹-۷۸۷

بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر القاء آندروژنز در کشت بساک گل جعفری آفریقایی (*Tagetes erecta*) و گل جعفری فرانسوی (*Tagetes patula*)

رضا شفیعی[1]- محمدرضا عبداللهی[2]*- اصغر میرزائی اصل[3]- سید سعید موسوی[4]- حسن ساریخانی[5]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۴

چکیده

تولید گیاهان هاپلویید، یک موضوع با اهمیت در برنامه‌های به نژادی جهت دستیابی سریع به لاین‌های خالص به منظور تولید بذر هیبرید می‌باشد. در پژوهش حاضر، پاسخ بساک‌های دو گونه گل جعفری (*Tagetes* spp.) به القاء آندروژنز در کشت بساک در قالب دو آزمایش مجزا بررسی شد. در آزمایش اول، اثر متقابل ژنوتیپ (T_1، T_2، T_3، T_4 و T_5) و اندازه غنچه (۵-۳، ۱۰-۵ و ۱۵-۱۰ میلی‌متر) و در آزمایش دوم، اثر متقابل روش اعمال تیمار مانیتول (اضافه کردن غلظت‌های مختلف مانیتول به محیط کشت اصلی و پیش‌تیمار بساک‌ها با محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف مانیتول بمدت ۲۴ ساعت) و غلظت‌های مختلف مانیتول (صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ مولار) بر القاء آندروژنز در کشت بساک گل جعفری بررسی گردید. نتایج نشان داد که مرحله میکروسپوری مناسب جهت کشت بساک گیاه گل جعفری مرحله تک هسته‌ای میانی تا دوهسته‌ای ابتدایی می‌باشد و مراحل میکروسپوری مذکور در غنچه‌هایی با اندازه ۱۰-۵ میلی‌متر مشاهده شد. همچنین ژنوتیپ‌های T_3 و T_4 بیشترین پاسخ به آندروژنز را نشان دادند. در آزمایش دوم بیشترین درصد کالوس‌زایی از تیمار محیط کشت جامد حاوی ۰/۲ مولار مانیتول با ۹۵/۵۵ درصد کالوس‌زایی بدست آمد. پیش‌تیمار با محیط کشت مایع حاوی ۰/۵ مولار مانیتول در روش دوم از نظر صفت تعداد نوساقه به ازای هر بساک و تعداد نوساقه به ازای هر کالوس برتری نشان داد. پیش‌تیمار با محیط کشت مایع حاوی ۰/۲ مولار مانیتول با باززایی گیاه کامل ۳۱/۱۱ درصد از نظر این صفت بعنوان برترین تیمار شناخته شد. نتایج شمارش کروموزومی نشان داد که از ۵ گیاه بررسی شده ۳ گیاه دی هاپلوئید بودند و ۲۴ کروموزوم در سلول‌های نوک ریشه‌شان داشتند در حالی‌که گیاهان مادری بررسی شده تتراپلوئید بودند و ۴۸ کروموزوم در سلول‌های نوک ریشه‌شان نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: آندروژنز، هاپلوئید، کشت بساک، گل جعفری، مانیتول

مقدمه

با توجه به اهمیت اقتصادی پرورش گل‌ها و گیاهان زینتی در دنیا، استفاده از فناوری‌ها و روش‌های جدید در به نژادی این گیاهان می‌تواند نقش بسزایی در بازاریابی این محصولات و تجارت آن‌ها در بازارهای بین‌المللی داشته باشد. بر اساس آمار جهانی صادرات گل و گیاهان زینتی، سالانه حدود ۲۷ میلیارد دلار سود خالص از فروش این گیاهان عاید کشورهای مختلف می‌شود (Chizari *et al.*, 2006). بیشتر تولیدات جهانی گل و گیاهان زینتی مربوط به کشورهای اروپایی است و بر اساس آمار سال ۲۰۱۲، کشور هلند با ۳۱ درصد از کل تولیدات کشورهای اروپایی، در صدر تولید کنندگان این گیاهان در اروپا و جهان قرار گرفته است (Amiri Fedardi and Hosseini, 2012).

گل جعفری با نام عمومی marigold و نام علمی *Tagetes* spp. گیاهی یکساله، زینتی و اسانس‌دار می باشدکه در بسیاری از نقاط

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات و دانشیاران، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: m.abdollahi@basu.ac.ir)
۵- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
https://doi.org/10.22067/jhs.2023.79502.1207

جهان عمدتا به عنوان گیاه زینتی کشت می‌شود. این جنس ۳۶ گونـه دارد که گونه‌های *Tagetes erecta*، *Tagetes patula* و *Tagetes minuta* به طور گسترده شناخته شده‌اند (Neher, 1968). گونه‌هـای متعددی از این گیاه در بسیاری از کشورهای اروپـایی، افریقـا، آسـیا و استرالیا وجود دارد. در سال‌های اخیر اهمیت گل جعفری به‌عنوان منبع تجـاری اسـانس، ترکیبـات بیولـوژیکی مـورد اسـتفاده در کشـاورزی ارگانیک، مواد غذایی، رنگدانه‌ها و همچنین در صنایع آرایشـی اثبـات شده است (Anonymous, 1976). همچنین گونه *T. minuta* به طـور عمده برای تولید اسانس کشت می‌شود. اسـتفاده از اسـانس گونـه *T. minuta* برای کنترل پشه مالاریا در جنوب غربی کنیـا نیـز گـزارش شده است (Wanzala and Ogoma, 2013). همچنین این گونه دارای اثرات ضد فشار خون، ضد التهابی، ضـد افسـردگی، ضـد میکروبـی و فعالیت‌های ضد باکتریایی است (Senatore and Feo, 1999). دو گونه *T. minuta* و *T. erecta* به صورت کشت مخلوط با سایر محصولات زراعی برای کنترل نماتد نیز استفاده شده‌اند (Prasad *et al.*, 1992).

در برنامه‌های اصلاحی گیاهـان، بـه ویـژه تولیـد بـذور هیبریـد، گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف (Doubled haploid)، بـه‌عنـوان منابع تولید لاین‌های هموزایگـوس بسـیار مفیـد هسـتند. تولیـد ایـن گیاهان از طریق جنین‌زایی گامتیک باعث توسعه یک مرحله‌ای لایـن های هموزیگوت کامل از والدین هتروزیگوت می‌شود و در مقایسه بـا روش‌های متداول به‌نژادی که چندین نسل از خودگشنی را به کار می برد، زمان لازم برای تولید گیاهان هموزیگوت را کوتاه می‌کند. چندین روش برای بدست آوردن گیاهان هاپلوئید وجود دارد که از بـین آنهـا، کشت بساک و کشت میکروسپور جدا شده، موثرترین روش‌ها هسـتند و به طور گسترده مورد استفاده قرار مـی‌گیرنـد (Germana, 2011). ژنوتیپ، وضعیت فیزیولوژیکی و شرایط رشد گیاهـان مـادری، مرحلـه رشد و نموی میکروسپورها، پیش‌تیمار جوانه‌های گل یا بساک، ترکیب محیط کشت و شرایط کشت آزمایشگاهی، بـه همـراه اثـرات متقابـل آنها، همه عواملی هستند که تأثیر بسزایی در پاسخ بساک‌های کشـت شـده در شـرایط درون شیشـه‌ای بـه رویـان‌زایـی گـامتی دارنـد (Germana, 2011). در بین عوامل درونی، ژنوتیپ گیاهـان مـادری دارای نقش بسیار مهمی در کشت بساک است. این امر توسط بسیاری از محققان که بر روی کشت بساک کار کرده‌اند بـه رسـمیت شـناخته شده است و ارقام مختلف مربـوط بـه یـک گونـه دارای پاسخ‌هـای متفاوتی به کشت بساک هسـتند (Germana, 2011). در پژوهشـی از کشت بساک ۲۱ رقم گندم مورد مطالعه، تمامی ارقام منجر بـه تولیـد گیاه هاپلویید شدند، در حالی‌که در کشت بساک تعداد زیادی از ارقـام برنج، تولید گیاه هاپلوئید فقط در زیرگونه *japonica* امکان‌پـذیر بـود (Bajaj, 1990). مطالعات انجـام شـده در سـیب‌زمینـی نشـان داد کـه توانایی جنین‌زایی میکروسپور تحت کنترل صفتی است که چندین ژن مغلوب در آن دخیل هسـتند (Rudolf *et al.*, 1999; Smykal, 2000).

پژوهش‌های بسیاری در زمینه‌ی تأثیر ژنوتیپ بر روی کشت بساک و میکروسپور، درگیاهان صورت گرفته اسـت. در پژوهشـی کـه توسـط محققین (Yingchun *et al.*, 2011) بر روی کشت بساک گیـاه زینتـی گل جعفری انجام شد، تأثیر ژنوتیپ‌های مختلف بر القـاء آنـدروژنز در این گیاه مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج حاصله نشان داد که میـزان پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف بر القا آندروژنز متفاوت می‌باشد.

مرحله رشد و نموی گرده عاملی پیچیده‌ای است که به شـدت در موفقیت کشت بساک تأثیر می‌گذارد. مرحله مناسب دانه گـرده بـرای رشد و نمو رویان‌زایی بسته به گونه گیاهی متفاوت است، اما بـه طـور کلی، دوره حساسیت میکروسپور به تیمارهای القـایی در حـدود اولـین تقسیم میتوز دانه گرده، بین مراحل میکروسپور تک هسته‌ای واکوئـل دار تا ابتدای دو هسته‌ای اسـت (Touraev *et al.*, 2001). محققـین دیگـر (Kott *et al.*, 1988)، بـرای هـر مرحلـه‌ی رشـد و نمـوی میکروسپور رابطه مستقیمی بین انـدازه غنچـه، پـرچم، میکروسـپور و اندازه هسته به دست آورده‌اند. علاوه بر انـدازه غنچـه کـه بـه‌عنـوان معیاری برای تشخیص ظاهری مرحله نمو میکروسـپور اسـتفاده مـی گردد، مشخص شده است که رنـگ پـرچم نیـز در موفقیـت سیسـتم کشت بساک و میکروسپور می‌تواند مؤثر باشـد زیـرا رنـگ پـرچم بـا مرحله نمو میکروسپور مرتبط است (Song *et al.*, 2007).

بر اساس یک مطالعه مـروری (Shariatpanahi *et al.*, 2006)، در بسیاری از گونه‌های گیاهی مشاهده شده است که پیش‌تیمارهـای فیزیکی یا شیمیایی قبل از کشت بساک، وقتی روی جوانه‌هـای گـل کامل یا بساک‌های خارج شده اعمال می‌شوند به عنوان محرکی برای القای مسیر اسپوروفیت عمل می‌کنند و از رشد و نمو گـرده‌ای (مسـیر گامتوفیتیک) جلوگیری می‌کنند. پیش‌تیمارهای مختلفی ماننـد سـرما، دمای بـالا، رطوبـت زیـاد، تـنش آب، کمبـود اکسـیژن، سـانتریفیوژ، گرسنگی ساکارز و نیتروژن، اتانول، اشعه گاما، مـواد تخریـب کننـده میکروتوبول‌ها، شوک الکتریکی، pH بالای محیط کشت، پیش‌تیمار با فلزات سنگین از جمله پیش‌تیمارهای رایـج اسـتفاده شـده در کشـت بساک و میکروسپور گیاهان بوده است.

با توجه به اینکه گیاه گل جعفری یک گیاه دگرگرده افشـان مـی باشد، تولید لاین‌های خالص به منظور تولید بذر هیبرید در این گیاه از ارزش بالایی برخوردار می‌باشد. لذا مطالعه حاضر به منظور بهینه‌سازی تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت بساک در این گیاه انجام گردیـد و اثر عوامل مختلفی از قبیل، نوع گونه و ژنوتیپ گل جعفری، مرحلـه رشد و نموی دانه گرده و همچنـین کـاربرد پـیش‌تیمـار مـانیتول بـر رویان‌زایی گامتی در کشت بساک این گیاه زینتی مـورد بررسـی قـرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق بذر پنج رقم هیبرید گل جعفری از دو گونه آفریقایی (*T. erecta*) و فرانسوی (*T. patula*) با نامگذاری اختصاری T_1، T_2، T_3، T_4 و T_5 از شرکت هم آرا ژن رویان تهیه شدند که مشخصات آنها در جدول ۱ آورده شده است. بذرها ابتدا در سینی نشاء حاوی کوکوپیت و پرلیت با عمق ۲-۱ سانتی‌متری کشت شدند و در اتاق رشد گیاهی با دمای ۲۲ و ۱۶ درجه سانتی‌گراد (روز و شب) و فتوپریود ۱۶ و ۸ برای روز و شب قرار داده شدند. به منظور رشد مطلوب گیاهان در اتاق رشد گیاهی و جلوگیری از تنش کمبود عناصر غذایی، از محلول غذایی حاوی عناصر ماکرو و میکرو محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) با غلظت یک پنجم استفاده گردید. به‌طوری‌که برای هر گلدان، ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول غذایی مذکور، همراه با آب آبیاری به صورت هفته‌ای مورد استفاده قرار می‌گرفت.

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های استفاده شده د ر آزمایشات

Table 1- Characterizations of used marigold genotypes in the experiments

کد Code	ژنوتیپ/رقم Genotype/Cultivar	گونه Species
T_1	Vectra	*T. erecta*
T_2	*	*T. patula*
T_3	Tangerine	*T. patula*
T_4	Carmen	*T. patula*
T_5	*	*T. erecta*

*: نسل F_2 بوده و مشخصات ژنوتیپ نامعلوم می باشد.

*: It is F_2 generation and the genotype characteristics are unknown.

برای ضد عفونی غنچه‌های گل جعفری، در زیر هود لامینار غنچه‌ها در هیپوکلریت سدیم (V/V) ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس ۳ مرتبه، هر بار به مدت ۳ دقیقه، با آب مقطر استریل و سرد شده آبکشی شدند. جهت کشت بساک، بساک‌ها را از داخل گلچه‌ها بیرون آورده و به‌نحوی‌که بافت سوماتیکی دیواره بساک آسیبی نبیند، از میله پرچم جداسازی و بر روی محیط کشت قرار گرفتند و سپس در اتاقک رشد قرار گرفتند. در کشت بساک گل جعفری از محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون نفتالین استیک اسید و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل-آمینوپورین و جهت واکشت نمودن از محیط کشت MS بدون هورمون استفاده شد و کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز جهت تهیه این محیط کشت از شرکت مرک آلمان و سیگمای آمریکا تهیه شدند. پتری‌دیش‌ها بعد از کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به همراه تاریکی به مدت ۴ روز قرار گرفتند و بعد از سپری شدن این مدت به اتاق رشد منتقل شدند.

جهت تعیین مرحله رشد و نموی میکروسپورهای داخل بساک، بساک‌ها از سایزهای مختلف غنچه جدا شدند و بمدت ۲۴ ساعت در داخل رنگ استوکارمن ۱ درصد (۱ گرم رنگ کارمن در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال ۴۵ درصد) نگهداری شدند (Chardoli Eshaghi *et al.*, 2015). سپس جهت مشاهده مراحل رشد و نموی میکروسپورها، بساک‌های رنگ‌آمیزی شده در روی لام پاره شدند تا میکروسپورها آزاد گردند و سپس توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ برابر، مراحل مختلف رشد و نموی میکروسپورها مشاهده شدند.

هر یک از تیمارهای آزمایش شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل یک عدد پتری‌دیش حاوی ۱۵ عدد بساک بود. پتری‌دیش‌های کشت شده پس از اعمال تیمار دمایی مربوطه، در اتاقک رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۴۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۰ درصد نگهداری شدند.

برای محاسبه صفات مورد مطالعه از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$$\text{درصد کالوس زایی} = \frac{\text{تعداد کالوس}}{\text{تعداد بساک}} \times 100$$

$$\text{میانگین تعداد نوساقه به ازای هر بساک} = \frac{\text{تعداد نوساقه}}{\text{تعداد بساک}}$$

$$\text{میانگین تعداد نوساقه به ازای هر کالوس} = \frac{\text{تعداد نوساقه}}{\text{تعداد کالوس}}$$

$$\text{درصد باززایی گیاه کامل} = \frac{\text{تعداد گیاه باززایی شده کامل}}{\text{تعداد بساک}} \times 100$$

$$\text{Callogenesis percentage} = \frac{\text{Number of callus}}{\text{Number of anther}} \times 100$$

$$\text{Mean number of shoot per anther} = \frac{\text{Number of shoot}}{\text{Number of anther}}$$

$$\text{Mean number of shoot per callus} = \frac{\text{Number of shoot}}{\text{Number of callus}}$$

$$\text{Percentage of complete plant regeneration} = \frac{\text{Number of complete regenerated plant}}{\text{Number of anther}} \times 100$$

جهت بررسی سطح پلوییدی گیاهان مادری و گیاهان باززایی شده و شمارش تعداد کروموزوم‌های آنها، بعد از برداشت نوک ریشه گیاهان مادری و گیاهان باززایی شده، پروتکل محققین قبلی (Zhang *et al.*, 2011) به کار برده شد. به منظور نرمال‌سازی، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن، از نرم افزارهای آماری MINITAB 14.0 و SPSS 16.0 استفاده شد. در آزمایش‌هایی که توزیع باقیمانده داده‌ها نرمال نبود از تبدیل رادیکال + ۰/۵ به منظور نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. بعد از انجام آزمون نرمال بودن، آنالیز آماری روی داده‌های تبدیل شده انجام گرفت و از مربع میانگین داده‌های اصلی در جدول تجزیه واریانس استفاده شد. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده گردید.

طرح آزمایشی مورد استفاده بصورت زیر بود:

آزمایش ۱: بررسی اثر اندازه‌های مختلف غنچه و نوع ژنوتیپ:

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور ژنوتیپ در ۵ سطح (T_1، T_2، T_3، T_4 و T_5) و اندازه غنچه در سه سطح (۵-۳، ۱۰-۵ و ۱۵-۱۰ میلی‌متر) انجام شد.

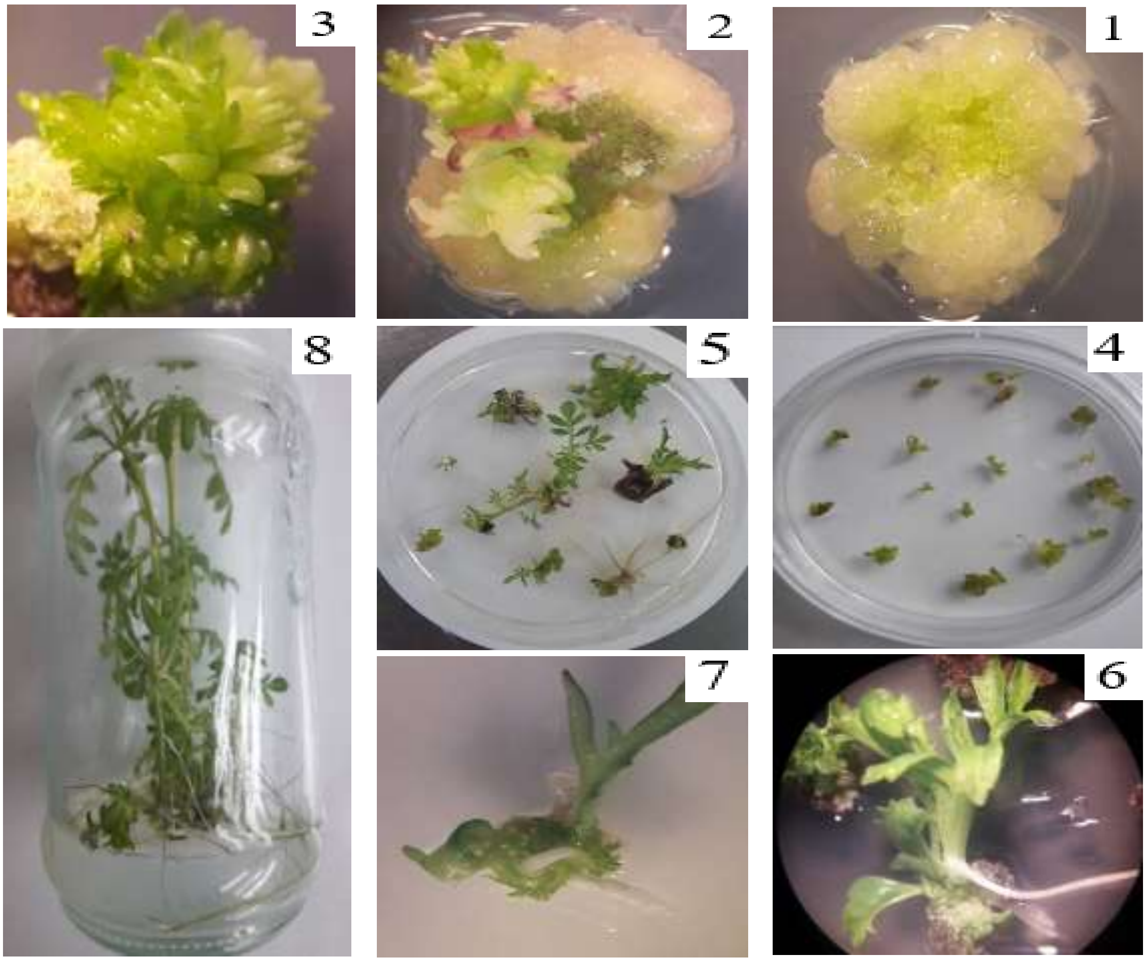
آزمایش ۲: بررسی اثر مانیتول و روش اعمال آن:

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد که فاکتور اول شامل روش اعمال مانیتول و فاکتور دوم شامل غلظت‌های مختلف مانیتول در ۵ سطح (صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ مولار) بود. فاکتور روش اعمال مانیتول در ۲ سطح (اضافه کردن غلظت‌های مختلف مانیتول به محیط کشت اصلی و پیش‌تیمار بساک‌ها با محیط کشت مایع حاوی غلظت‌های مختلف مانیتول به مدت ۲۴ ساعت) بود. در این آزمایش از ژنوتیپ T_4 که در آزمایش اول در تمامی صفات مربوط به آندروژنز از پاسخ مطلوبی برخوردار بود، استفاده شد.

نتایج و بحث

تشکیل کالوس و القاء نوساقه بر روی کالوس‌ها در کشت بساک گل جعفری

جهت کشت بساک گل جعفری بساک‌های مربوط به اندازه غنچه مناسب که میکروسپورهای آنها در مرحله تک هسته‌ای میانی تا دو هسته‌ای ابتدایی بودند، بر روی محیط کشت قرار داده شدند. در اکثر ریز نمونه‌ها بعد از حدود ۲ الی ۳ هفته کالوس‌زایی مشاهده گردید (شکل ۱-۱). حدود ۲ هفته بعد از کالوس‌زایی نیز، نوساقه‌ها بر روی کالوس‌ها ایجاد شدند (شکل‌های ۱-۲، ۱-۳ و ۱-۴). همچنین حدود دو ماه بعد از کشت بساک، گیاهان کامل بدست آمدند (شکل‌های ۱-۵، ۱-۶، ۱-۷ و ۱-۸).



شکل ۱- کالوس‌زایی، ایجاد نوساقه و باززایی گیاه در کشت بساک گل جعفری

۱) کالوس‌های بدست آمده، ۲، ۳ و ۴) نوساقه‌های ایجاد شده بر روی کالوس‌ها. ۵، ۶، ۷ و ۸) گیاهان کامل بدست آمده از کشت بساک

Figure 1- Callogenesis, shoot formation and plant regeneration in anther culture of marigold

1) The obtained calli. 2, 3 and 4) Shoots created on calli. 5, 6, 7 and 8) - Complete plants regenerated from anther cultures.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ و اندازه غنچه بر صفات آندروژنز در کشت بساک گل جعفری

Table 2- ANOVA for the effect of genotype and bud size on androgenic traits in the anther culture of marigold

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares			
		کالوس‌زایی Callogenesis (%)	باززایی گیاه Plant regeneration (%)	تعداد نوساقه به ازای هر بساک Number of shoot per anther	تعداد نوساقه به ازای هرکالوس Number of shoot per callus
ژنوتیپ Genotype (G)	4	65.581***	7.846***	0.125***	0.228***
اندازه غنچه Bud size (BS)	2	5.583**	2.807*	0.039*	0.067*
G×BS	8	4.469**	1.891*	0.031*	0.059**
خطای آزمایشی Error	30	0.891	0.710	0.011	0.013
ضریب تغییرات CV (%)		12.39	51.08	12.92	13.87

***، ** و *: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۵

***, ** and *: significant at $p\leq 0.001$, $p\leq 0.01$ and $p\leq 0.05$, respectively.

آزمایش ۱: بررسی اثر اندازه‌های مختلف غنچه و نوع ژنوتیپ بر صفات مختلف آندروژنز

نتایج تجزیه واریانس اثر اندازه غنچه و نوع ژنوتیپ بر صفات مختلف مورد مطالعه در کشت بساک گل جعفری در جدول ۲ نشان داده شده است.

اندازه غنچه ۱۰-۵ میلی‌متر (شکل ۲-۱) که بیشترین پاسخ‌دهی را در آزمایش اول نشان داد، دارای بساک‌های مناسب (شکل ۲-۲) حاوی میکروسپورهایی بود که اکثراً در مرحله تک هسته‌ای میانی تا دو هسته‌ای ابتدایی قرار داشتند (شکل ۲-۳). نتایج ما تقریباً با نتایج پژوهشگران قبلی (Ravindra Kumar and Singh, 2018) مطابقت داشت. آنها گزارش کردند میکروسپورهایی که در مرحله تک هسته‌ای ابتدایی تا دوهسته‌ای ابتدایی هستند، بیشترین پاسخ‌دهی به القا آندروژنز در کشت بساک گل جعفری از خود نشان می‌دهند.



شکل ۲- ۱) مناسب‌ترین اندازه غنچه گل جعفری برای کشت بساک (۱۰-۵ میلی متر)، ۲) گلچه و بساک مناسب گل جعفری برای کشت بساک. ۳) میکروسپورها در مرحله تک هسته‌ای میانی تا دو هسته‌ای ابتدایی (بزرگنمایی ٤٠ برابر)

Figure 2- 1) The most suitable size of the bud for anther culture (5-10 mm), 2) Suitable florets and anthers of marigold for anther culture, 3) Microspores in the mid-uninucleate stage to early binucleate stage (magnification: 40x)

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها برای صفات درصد کالوس‌زایی، میانگین تعداد نوساقه به ازای هر بساک، میانگین تعداد نوساقه به ازای هر کالوس و درصد باززایی گیاه کامل در کشت بساک گل جعفری در آزمایش اول به شرح زیر می‌باشد:

درصد کالوس‌زایی

مقایسه میانگین اثرات متقابل اندازه غنچه و ژنوتیپ برای صفت درصد کالوس‌زایی در شکل ۳-۱ نشان داده شده است. بیشترین درصد کالوس‌زایی در ژنوتیپ T_2 و در غنچه‌هایی با اندازه ۵-۳، ۱۰-

۵ و ۱۵–۱۰ میلی‌متر (به‌ترتیب به میزان ۹۷/۷۸، ۱۰۰، ۹۷/۷۸ درصد) و همچنین در ژنوتیپ T_5 با اندازه غنچه ۱۰–۵ میلی‌متر (به میزان ۹۷/۷۸ درصد) مشاهده گردید. کمترین درصد کالوس‌زایی (۰ درصد) به غنچه‌های ۱۵–۱۰ میلی‌متری در ژنوتیپ T_1 اختصاص یافت.

تعداد نوساقه به ازای هر بساک

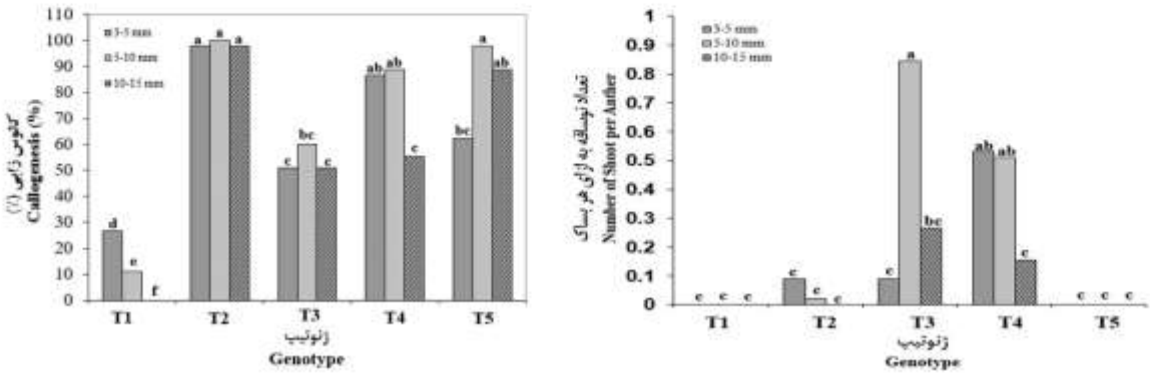
مقایسه میانگین اثرات متقابل اندازه غنچه و ژنوتیپ برای صفت متوسط تعداد نوساقه به ازای هر بساک در شکل ۳–۲ نشان داده شده است. بیشترین تعداد نوساقه به ازای هر بساک مربوط به غنچه‌های ۱۰–۵ میلی‌متری در ژنوتیپ T_3 (به میزان ۰/۸۴) و همچنین هر سه اندازه مختلف غنچه در ژنوتیپ‌های T_5 و T_1 و اندازه غنچه ۱۵–۱۰ میلی‌متر در ژنوتیپ T_2 هیچ نوساقه‌ای تولید نکردند.

تعداد نوساقه به ازای هر کالوس

مقایسه میانگین اثرات متقابل اندازه غنچه و ژنوتیپ برای صفت میانگین تعداد نوساقه به ازای هر کالوس در شکل ۴–۱ نشان داده شده است. اندازه غنچه ۱۰–۵ میلی‌متر در ژنوتیپ T_3 با میانگین ۱/۳۶۹ نوساقه بیشترین تولید نوساقه به ازای هر کالوس را ایجاد کرد. هرسه اندازه مختلف غنچه در ژنوتیپ‌های T_1 و T_5 و همچنین اندازه های غنچه ۱۰–۵ میلی‌متر و ۱۵–۱۰ میلی‌متری در ژنوتیپ T_2 کمترین نوساقه به ازای هر کالوس را تولید کردند.

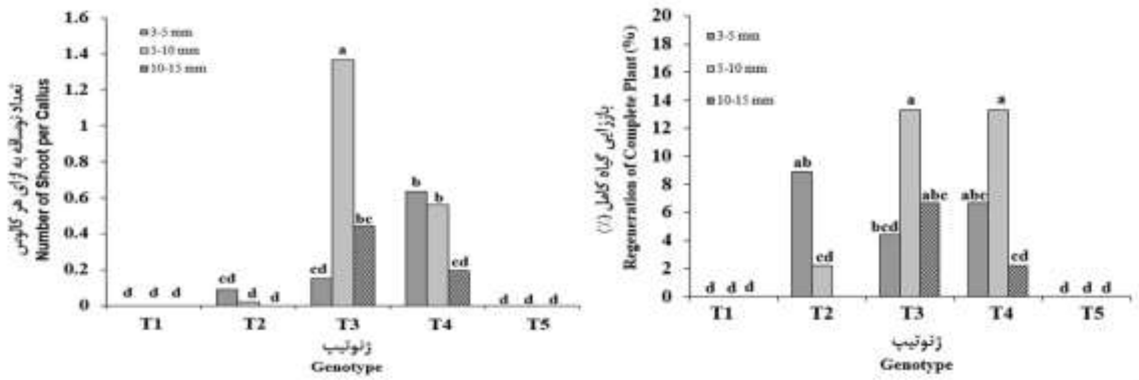
درصد باززایی گیاه کامل

مقایسه میانگین اثرات متقابل اندازه غنچه و ژنوتیپ برای صفت درصد باززایی گیاه کامل در شکل ۴–۲ نشان داده شده است. اندازه غنچه ۱۰–۵ میلی‌متری در ژنوتیپ‌های T_3 و T_4 با ۱۳/۳۳ درصد باززایی گیاه به عنوان بهترین تیمار از لحاظ صفت درصد باززایی گیاه شناخته شدند. درهر سه اندازه غنچه در ژنوتیپ‌های T_1 و T_5 هیچ باززایی گیاهی مشاهده نشد.



شکل ۳- اثر متقابل ژنوتیپ × اندازه‌های مختلف غنچه بر ۱) درصد کالوس زایی و ۲) تعداد نوساقه به ازای هر بساک، در کشت بساک گل جعفری

Figure 3- The interaction effect of different genotypes ×bud sizes on 1) The callogenesis percentage (*p≤0.01*) and 2) The number of shoot per anther in anther culture of marigold
(DMRT, *p≤0.05*).



شکل ٤- اثر متقابل ژنوتیپ × اندازه غنچه بر ۱) تعداد نوساقه به ازای هر کالوس و ۲) میزان باززایی گیاه کامل در کشت بساک گل جعفری

Figure 4- The interaction effect of genotypes ×bud sizes on 1) The number of shoot per callus (*p≤0.01*) and 2) regeneration percentage of complete plant in anther culture of marigold
(DMRT, *p≤0.05*).

در این آزمایش اثر اندازه‌های مختلف غنچه ۵ ژنوتیپ مختلف گل جعفری بردرصد کالوس‌زایی، تعداد نوساقه به ازای هر بساک، تعداد نوساقه به ازای هر کالوس و درصد باززایی در کشت بساک گل جعفری بررسی شد. نتایج این آزمایش نشان داد که اندازه غنچه ۱۰-۵ میلی متری دارای بساک‌هایی می‌باشند که میکروسپورهای آنها در مرحله رشد و نمو مناسبی جهت القاء کالوس و نوساقه هستند. در آزمایشی که توسط پژوهشگران پیشین (Abul Kalam Azad *et al.*, 2013) انجام گرفت، مشخص گردید که بساک‌های کشت شده غنچه‌های دارای اندازه متوسط در گیاه *Cynometra cauliflora* (۲۲-۱۶ میلی‌متر) و گیاه *Cynometra goudotiana* (۱۴-۱۲ میلی‌متر) بالاترین واکنش به آندروژنز را نشان می‌دهند. مطابق بررسی‌های صورت گرفته توسط محققین دیگر (Chardoli Eshaghi *et al.*, 2014) در گیاه گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis*)، اندازه مناسب غنچه که حاوی بهترین مرحله نمو میکروسپور جهت انجام کشت بساک می‌باشد، اندازه متوسط غنچه (۷-۵ میلی‌متر) است.

همچنین محققین دیگر (Ravindra Kumar and Singh, 2018) نشان دادند که بین اندازه گلچه، غنچه و مرحله توسعه میکروسپوری در کشت بساک گل جعفری همبستگی وجود دارد. آنها گزارش کردند میکروسپورهایی که در مرحله تک هسته‌ای ابتدایی تا دوهسته‌ای ابتدایی بودند، بیشترین پاسخ‌دهی به القا آندروژنز از خود نشان می دهند و اندازه گلچه ۳/۵-۳ و ۴-۳/۵ میلی‌متر به‌ترتیب در جعفری آفریقایی و جعفری فرانسوی دارای بیشترین میکروسپور در مرحله تک هسته‌ای ابتدایی تا دوهسته‌ای ابتدایی می‌باشند.

یکی از فاکتورهای بسیار مهم بر القا آندروژنز در گیاهان، فاکتور ژنوتیپ یا خصوصیات ژنتیکی گیاهان مادری می‌باشد. نتایج حاصل از تحقیقات دانشمندان قبلی حاکی از آن است که ژنوتیپ‌های مختلف در شرایط رشدی و کشت بافتی یکسان پاسخ‌دهی متفاوتی نسبت به القاء آندروژنز از خود نشان می‌دهند. محققین (Yingchun *et al.*, 2011) تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف جعفری فرانسوی را بر القاء آندروژنز در کشت بساک گل جعفری بررسی کردند و گزارش کردند رقم *T. patula* "21605" به‌طور معنی‌داری از لحاظ درصد کالوس‌زایی و باززایی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتر بوده است.

در آزمایش ما همچنین برتری ژنوتیپ‌ها از نظر صفات مختلف آندروژنز با هم متفاوت بود، اما از بین صفات مختلف آنچه از لحاظ تولید گیاهان هاپلویید اهمیت دارد صفت درصد باززایی می‌باشد، که ژنوتیپ‌های T_3 و T_4 بیشترین درصد باززایی را در بین ارقام مختلف به خود اختصاص دادند. این دو ژنوتیپ جز گونه جعفری فرانسوی هستند و از بین دو گونه *T. erecta* و *T. patula* گونه *T. patula* (جعفری فرانسوی) نسبت به گونه دیگر پاسخ‌دهی بهتری برای صفت آندروژنیک از خود نشان داد. بنابر نتایج حاصل از این آزمایش در آزمایش‌های بعدی از ژنوتیپ T_4 با اندازه غنچه ۱۰-۵ میلی‌متر استفاده شد.

آزمایش ۲: بررسی اثر مانیتول و روش اعمال آن بر صفات مختلف آندروژنز

نتایج تجزیه واریانس اثر دو روش مختلف اعمال مانیتول و غلظت‌های مختلف آن برصفات مختلف مورد مطالعه در کشت بساک گل جعفری در جدول ۳ نشان داده شده است. روش‌های اعمال تیمار مانیتول، غلظت‌های مختلف مانیتول و همچنین اثرات متقابل آنها برای صفت درصد کالوس‌زایی، میانگین تعداد نوساقه به ازای هر بساک، میانگین تعداد نوساقه به ازای هر کالوس و درصد باززایی گیاه کامل در سطح ۰/۰۰۱ درصد تفاوت اماری معنی‌داری نشان دادند.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در آزمایش سوم برای هر یک از صفت‌ها به صورت زیر می‌باشد:

درصد کالوس‌زایی

مقایسه میانگین اثرات متقابل روش اعمال تیمار و غلظت مانیتول برای صفت درصد کالوس‌زایی نشان داد که اگر چه از نظر عددی غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ مولار مانیتول در محیط کشت جامد و غلظت های ۰ و ۰/۲ مولار در روش پیش‌تیمار با محیط مایع حاوی مانیتول بیش‌ترین درصد کالوس زایی را نشان دادند ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با غلظت‌های ۰ و ۰/۳ مولار مانیتول در محیط جامد و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ مولار مانیتول در روش پیش‌تیمار با محیط مایع نداشتند. استفاده از ۰/۵ مولار مانیتول در محیط کشت جامد هیچ کالوسی ایجاد نکرد (شکل ۵).

تعداد نوساقه به ازای هر بساک

مقایسه میانگین اثرات متقابل برای صفت میانگین تعداد نوساقه به ازای هر بساک نشان داد که پیش‌تیمار بساک‌ها با محیط کشت مایع حاوی ۰/۵ مولار مانیتول با تولید ۴/۴۷ نوساقه به ازای هر بساک بهترین تیمار از نظر صفت مورد نظر بود. استفاده از غلظت‌های ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ مانیتول در محیط کشت جامد و همچنین پیش تیمار بساک‌ها با محیط مایع حاوی ۰/۳ مانیتول منجر به تولید کمترین تعداد نوساقه به ازای هر بساک گردید (شکل ۵).

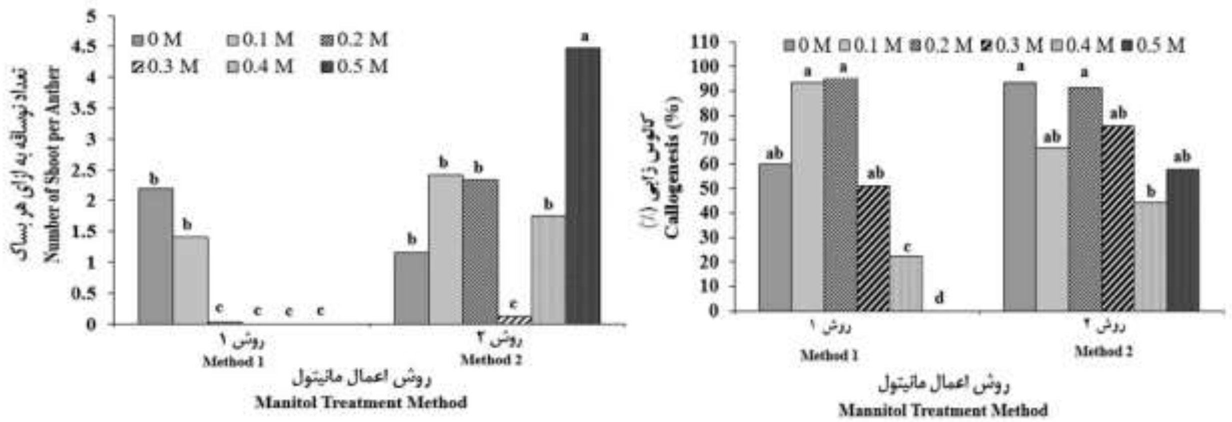
جدول ۳- تجزیه واریانس سطوح مختلف مانیتول بر صفات مختلف آندروژنز در کشت بساک گل جعفری

Table 3- Analysis of variance of the effect of different levels of mannitol on androgenic traits in anther culture of marigold

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares			
		کالوس زایی Callogenesis (%)	باززایی گیاه Plant regeneration (%)	تعداد نوساقه به ازای هر بساک Number of shoot per anther	تعداد نوساقه به ازای هرکالوس Number of shoot per callus
تیمار مانیتول Mannitol treatment (MT)	1	33.282***	41.290***	2.577***	4.440***
غلظت مانیتول Mannitol concentration (MC)	5	28.842***	11.990***	0.536***	0.969***
MT×MC	5	12.680***	6.281***	0.660***	1.666***
خطای آزمایشی Error	24	2.145	0.526	0.073	0.094
ضریب تغییرات CV (%)		19.76	23.86	21.82	21.55

***: معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۰۱

***: significant at $p\leq 0.001$



شکل ۵- اثرات متقابل روش اعمال مانیتول (شامل روش ۱: استفاده از مانیتول در محیط کشت و روش ۲: پیش تیمار بساک‌ها با محیط کشت مایع حاوی مانیتول بمدت ۲۴ ساعت) × غلظت مانیتول بردرصد کالوس‌زایی و تعداد نوساقه به ازای هر بساک

Figure 5- The interaction effects of mannitol treatment method (Including method 1: Use of mannitol in the culture medium and method 2: Pre-treatment of anthers with liquid media containing mannitol for 24 hours) ×mannitol concentration on the callogenesis percentage and number of shoot per anther

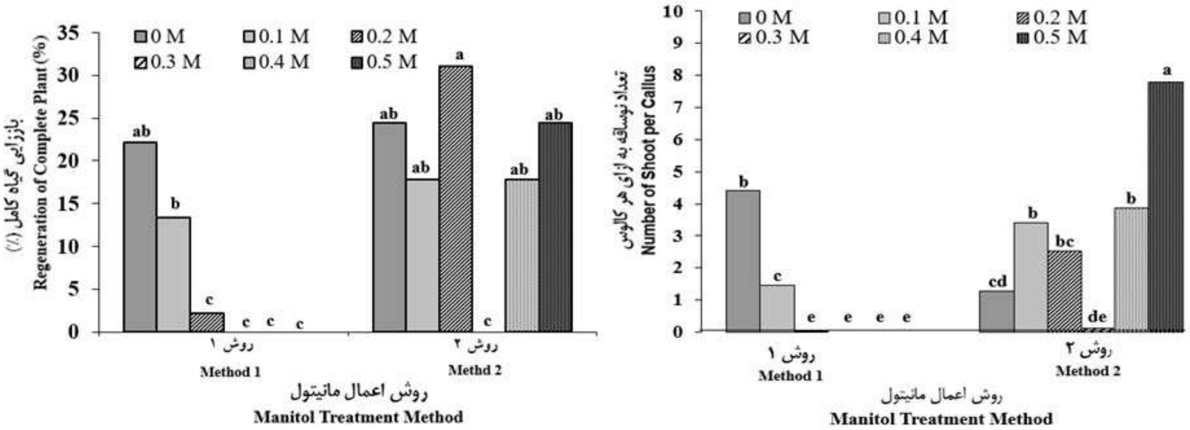
(DMRT, $p\leq 0.001$).

تعداد نوساقه به ازای هرکالوس

مقایسه میانگین اثرات متقابل برای صفت تعداد نوساقه به ازای هر کالوس نشان داد که پیش‌تیمار بساک‌ها با محیط کشت مایع حاوی ۰/۵ مولار مانیتول با تولید ۷/۷۵ نوساقه به ازای هر کالوس بهترین تیمار از نظر صفت مورد نظر بود. استفاده از غلظت‌های ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ مانیتول در محیط کشت جامد منجر به تولید کمترین تعداد نوساقه به ازای هر بساک گردید (شکل ۶)

درصد باززایی گیاه کامل

پیش تیمار بساک‌های گل جعفری با محیط کشت مایع حاوی ۰/۲ مولار مانیتول منجر به بیشترین درصد باززایی گیاه کامل (۳۱/۱۱ درصد) در مقایسه با شاهد و دیگر تیمارها گردید (شکل ۶). استفاده از غلظت‌های ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ مولار مانیتول در محیط کشت جامد و همچنین پیش‌تیمار بساک‌ها با محیط کشت مایع حاوی غلظت ۰/۳ مولار مانیتول منجر به کمترین درصد باززایی گیاه گردید.



شکل ٦- اثرات متقابل روش اعمال مانیتول (شامل روش ۱: استفاده از مانیتول در محیط کشت؛ روش ۲: پیش تیمار بساک‌ها با محیط کشت مایع حاوی مانیتول بمدت ۲٤ ساعت) × غلظت مانیتول بر میانگین تعداد نوساقه به ازای هر کالوس و درصد باززایی گیاه کامل

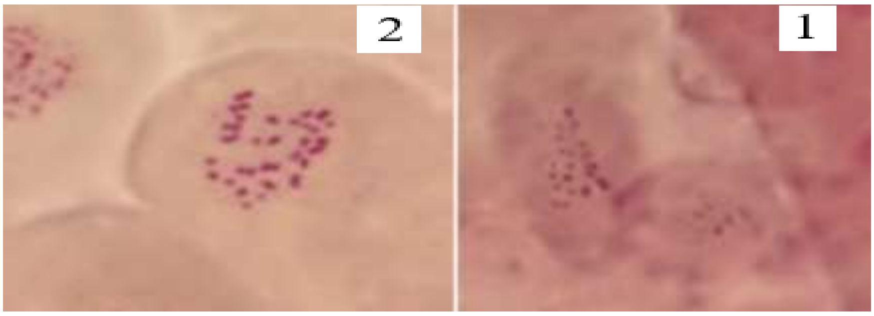
Figure 6- The interaction effects of mannitol treatment method (Including method 1: Use of mannitol in the culture medium and 2: Pre-treatment of anthers with liquid media containing mannitol for 24 hours) ×mannitol concentration on mean number of shoot per callus and regeneration percentage of complete plant
(DMRT, $p\leq 0.001$).

در این آزمایش تاثیر پیش‌تیمار مانیتول و روش اعمال آن بر روی صفات آندروژنز در کشت بساک گل جعفری بررسی گردید. تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲ مولار مانیتول در روش استفاده از مانیتول در محیط کشت جامد و پیش‌تیمارهای ۰ و ۰/۲ مولار در روش پیش‌تیمار با محیط مایع حاوی مانیتول منجر به بیشترین درصد کالوس‌زایی گردید. در حالی‌که پیش‌تیمار بساک‌ها با محیط کشت مایع حاوی ۰/۵ مولار مانیتول منجر به بیشترین میزان صفات میانگین تعداد نوساقه به ازای هر بساک و میانگین تعداد نوساقه به ازای هر کالوس گردید. از نقطه نظر درصد باززایی گیاه کامل پیش تیمار بساک‌ها با محیط مایع حاوی ۰/۲ مولار مانیتول بیشترین درصد باززایی گیاه را ایجاد کرد.

پژوهشگران (Sarah and James, 1990) با مطالعه روی کشت بساک جو گزارش کردند که انکوباسیون ۴ روزه بساک‌های کشت شده روی محیط کشت حاوی مانیتول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بهتر از انکوباسیون بساک‌ها در دمای۴ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین کشت بساک‌ها بر روی محیط کشت حاوی مانیتول منجر به افزایش تعداد گیاهان سبز گردید.

محققین دیگر (Cistué *et al.*, 1994) با اعمال پیش‌تیمارهای مختلف مانیتول بر روی بساک‌های گیاه جو نشان دادند که تیمار ۰/۷ مولار مانیتول بیشترین باززایی گیاه را در پی داشته است. همچنین در مطالعه دیگری استفاده از پیش‌تیمار گرسنگی (مانیتول ۰/۳ مولار) همراه با پیش‌تیمار سرمایی باعث تحریک تقسیم در میکروسپورها شده و آندروژنز را در ارقام کم پاسخ‌ده جو افزایش داد (Sheikh Rezaei and Shariat Panahi, 2016). به‌طور مشابه در آزمایش پژوهشگران دیگر (Hanna *et al.*, 2002)، استفاده از پیش‌تیمار سرما به همراه گرسنگی (مانیتول ۰/۳ مولار) بیشترین درصد کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه را در کشت بساک گیاه جو ایجاد کرد. در کشت بساک برنج، غلظت مانیتول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین پاسخ به آندروژنز از خود نشان داد (Kaushal *et al.*, 2014). محققین (Mandal and Maiti, 1999) گزارش کردند که مانیتول به عنوان یک عامل اسمتیک عمل می‌کند، و در کشت بساک برنج، تیمار۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث ایجاد بیشترین پاسخ آندروژنیک می‌شود.

مشاهده و شمارش کروموزوم‌های گیاهان مادری و گیاهان باززایی شده: مطالعات سیتولوژیکی بر روی نوک ریشه گیاهان مادری (ژنوتیپ T_4) و نوک ریشه ۵ گیاهان باززایی شده از کشت بساک در آزمایش اول انجام شد. نتایج نشان داد گیاهان مادری تتراپلویید بوده و دارای 2n=4x=48 کروموزوم می‌باشند همچنین تعداد ۳ عدد از گیاهان بررسی شده، دارای n=2x=24 کروموزوم و ماهیت دی هاپلویید بودند (شکل ۷).



شکل ۷- سلول‌های تتراپلویید و دی‌هاپلویید در گیاه گل جعفری ۱) سلول دی‌هاپلویید نوک ریشه گیاه باززایی شده با ۲٤ کروموزوم ۲) سلول تتراپلویید نوک ریشه گیاه مادری گل جعفری با ٤٨ کروموزوم

Figure 7- Tetraploid and dihaploid cells in marigold 1) Haploid cell at the root of a regenerated plant with 24 chromosomes 2) Tetraploid cell of the root tip of marigold mother plant with 48 chromosomes

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایشات نشان داد که در گیاه گل جعفری غنچه‌های با اندازه‌های ۱۰-۵ میلی‌متر حاوی میکروسپورهایی با مرحله رشد و نموی تک هسته‌ای میانی تا دو هسته‌ای ابتدایی بوده و بیشترین پاسخ را به القاء آندروژنز در این گیاه نشان دادند. همچنین از میان ژنوتیپ‌های مختلف ژنوتیپ‌های T_3، T_4 و از میان دو گونه آفریقایی و فرانسوی، گونه فرانسوی بیشترین پاسخ‌دهی را از خود نشان دادند. در آزمایش دیگر پیش‌تیمار بساک‌ها با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ مولار مانیتول در روش استفاده از مانیتول در محیط کشت مایع به مدت ۲۴ ساعت به‌ترتیب بیشترین درصد باززایی گیاه کامل و بیشترین میانگین تعداد نوساقه به ازای هر کالوس و بساک را نشان دادند.

منابع

1- Abul Kalam Azad, M., Golam Rabbani, M., & Amin, L. (2013). Effects of different culture media and flower bud size on haploid plant production through anther culture of three *Carica* species. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *11*, 296-300.

2- Amiri Fedardi, R., & Hosseini, A.H. (2012). *The importance of using ornamental-medicinal plants in urban green space to increase human well-being*, National Conference of Medicinal Plants pages 28-38. (In Persian with English abstract)

3- Anonymous. (1976). *Raw Materials*: Wealth of India. NISCOM, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India

4- Bajaj, Y.P.S. (1990). *In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding*. In: Bajaj, Y.P.S. (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, part I. Haploids in crop improvement, vol 12. Springer, Berlin, pp 1–44. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61499-6_1

5- Chardoli Eshaghi, Z., Abdollahi, M.R., Moosavi, S.S., Deljou, A., & Seguí-Simarro, J.M. (2015). Induction of androgenesis and production of haploid embryos in anther cultures of borage (*Borago officinalis* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *122*, 321–329. https://doi.org/10.1007/s11240-015-0768-5

6- Chardoli Eshaghi, Z., Abdollahi, M.R., Mousavi, S.S., & Deljoo A. (2014). *Effect of plant growth regulators and temperature pretreatment on callogenesis and embryogenesis of Borage (Borago officinalis L.) Plants through anther culture.* Master thesis in Bu Ali Sina University, pp. 23-29. (In Persian with English abstract)

7- Chizari, A.H., Yousefi, A., & Mousavi, S.H. (2006). A Survey on export target markets of Iran ornamental plants. *Eqtesad-e Keshavarzi va Towse'e*, *14*, 47-66. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.30490/aead.2006.58907

8- Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A.M., & Romagosa, I. (1994). Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Reports*, 13, 709-712. https://doi.org/10.1007/BF00231629

9- Germana, M.A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant cell Tissue and Organ Gulture*, *104*, 283-300. https://doi.org/10.1007/s11240-019-01616-4

10- Hanna, K., Helena, P., & Barbara, S. (2002). Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. *Journal of Applied Genetic*, *43*, 287-296.

11- Kaushal, L., Balachandran, S.M., Ulaganathan, K., & Shenoy, V. (2014). Effect of culture media on improving anther culture response of rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, *3*, 218–224.

12- Kott, L.S., Polsoni, L., & Beversdorf, W.D. (1988). Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica*

napus. *Canadian Journal of Botany*, *66*, 1658–1664. https://doi.org/10.1139/b88-22
13- Mandal, A.B., & Maiti, A. (1999). Anther culture response in Rice. I. Role of strains, adjuvants, osmoticum, carbon sources and phytohormones. *Plant Tissue Culture*, *9*, 25-34.
14- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, *15*, 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
15- Neher, R.T. (1968). The ethnobotany of Tagetes. *Economic Botany*, *22*, 317–325.
16- Prasad, D., Magla, D.K., Kumar, S., & Saini, M.L. (1992). Marigold plants for management of nematode populations in field. *Current Nematology*, *3*, 15–18.
17- Ravindra, Kumar, K., & Singh, K.P. (2018). Influence of growth regulators on callus induction and plant regeneration from anthers of *Tagetes* spp. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, *88*, 970–977.
18- Rudolf, K., Bohanec, B., & Hansen, M. (1999). Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. capitata L. Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breeding*, *118*, 237–241. https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.1999.118003237.x
19- Sarah, L.R., & James, M.D. (1990). Barley anther culture: Pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *20*, 235-240. https://doi.org/10.1007/BF00041887
20- Senatore, F., & Feo, V.D. (1999). Chemical composition of essential oil from *Tagetes mandonii* Sch Bip. (Asteraceae). *Flavour and Fragrance Journal*, *14*, 32–34. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199901/02)14:1<32::AID-FFJ772>3.0.CO;2-7
21- Shariatpanahi, M.E., Bal, U., Heberle-Bors, E., & Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, *127*, 519–534. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00675.x
22- Sheikh Rezaei, S., & Shariat Panahi, M. (2016). Effect of genotype, stress pre-treatment and culture medium on plant regeneration of barley microspores via anther culture. *Journal of Crop Breeding*, *8*(18), 112-118. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.29252/jcb.8.18.112
23- Smykal, P. (2000). Pollen embryogenesis the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development: Current status and future prospects. *Biologia Plantarum*, *43*, 481–489. https://doi.org/10.1023/A:1002835330799
24- Song, H., Lou, Q.F., Luo, X.D., Wolukau, J.N., Diao, W.P., Qian, C.T., & Chen, J.F. (2007). Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, *90*, 245–254. https://doi.org/10.1007/s11240-007-9263-y
25- Touraev, A., Pfosser, M., & Heberle-Bors, E. (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, *35*, 53–109. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(01)35004-8
26- Wanzala, W., & Ogoma, S.B. (2013). Chemical composition and mosquito repellency of essential oil of *Tagetes minuta* from the southern slopes of Mount Elgon in Western Kenya. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *16*, 216–232. https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.793975
27- Yingchun, Q., Yaomei, Y., & Manzhu, B. (2011). Establishment of plant regeneration system from anther culture of *Tagetes patula*. *African Journal of Biotechnology*, *10*, 17332-17338. https://doi.org/10.5897/AJB11.2166
28- Zhang, P., Zeng, L., Su, Y.X., Gong, X.W., & Wang, X.S. (2011). Karyotype studies on *Tagetes erecta* L. and *Tagetes patula* L. *African Journal of Biotechnology*, *10*, 16138–16144. https://doi.org/10.5897/AJB11.1994